



Ana Catarina Silva Teixeira

Ocratoxina A em cervejas: ocorrência e avaliação da exposição da população portuguesa

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Catarina Silva Teixeira

Ocratoxina A em cervejas: ocorrência e avaliação da exposição da população portuguesa

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu agradecimento e reconhecimento a todas as pessoas que colaboraram e contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho:

À Professora Doutora Celeste Matos Lino por toda a disponibilidade, dedicação, orientação, ensinamentos e pela exigência ao longo da dissertação.

À Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena por ter aceite ser co-orientadora desta investigação.

À Doutora Liliana Silva e ao Doutor André Pereira pelo companheirismo, orientação, ajuda e pelo conhecimento transmitido em todo o meu processo prático.

A todos os colegas com quem partilhei o laboratório de Bromatologia pelo convívio, companheirismo e entreaajuda.

Aos meus pais e irmã pelo apoio, dedicação, paciência e incentivo demonstrado ao longo do mestrado.

Aos meus amigos pela motivação e por todo o carinho constante.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação.

A todos o meu Bem Haja!

RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos que ocorrem de forma natural nos vários produtos agrícolas. A contaminação de alimentos por estes fungos ocorre em condições ambientais durante o crescimento das culturas, nas colheitas inadequadas, assim como, durante o transporte e mais frequentemente no armazenamento.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por alguns de fungos, tais como, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e o *Aspergillus niger*.

A OTA é conhecida principalmente pela sua nefrotoxicidade, apesar de possuir outras propriedades tóxicas. É também um composto tóxico cumulativo pela sua facilidade de absorção pelo aparelho digestivo mas de excreção lenta, através da via urinária. Está ainda classificada pela IARC como um possível carcinogénico humano, grupo 2B.

De entre as várias ocratoxinas, a OTA é considerada a mais tóxica, sendo a mais relevante para a segurança alimentar. Por este motivo, considerou-se essencial detetar e quantificar a concentração de OTA em cerveja consumida em Portugal.

A linearidade da OTA avaliada foi adequada, com valores em fase móvel (2,5 – 25 ng/mL) de $R^2=0,998$, e na matriz (0,25 – 2,5 µg/L) de $R^2=0,9985$. O valor do efeito matriz obtido foi de 100,05%. As recuperações variaram entre 81% e 86%. O LOD e o LOQ foram de 0,14 e 0,43 µg/L, respetivamente.

Neste estudo foi determinada a concentração de OTA em 33 amostras de cerveja, em que 9 amostras (27,27%) estavam contaminadas, com teores que variaram entre 0,174 e 11,25 µg/L, sendo o teor médio de 3,14 µg/L. Duas das amostras de cerveja de fabrico caseiro apresentaram concentrações consideráveis, com teores de 9,21 µg/L e 11,25 µg/L. As amostras de cerveja loira de fabrico industrial apresentaram frequências de deteção e teores inferiores às de fabrico artesanal/caseiro/de autor.

Palavras chave: micotoxina, ocratoxina A, cerveja, HPLC-FD.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi which occur naturally in several agricultural products. Food contamination by these fungi occurs under environmental conditions during crop growth, inadequate harvests, and also during transportation and storage, which is more often.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin which is produced by some species of fungi, such as *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus niger*.

OTA is mainly known for its nephrotoxicity, although it possesses other toxic properties. It is also a cumulative toxic compound because it is easily absorbed by the digestive system and is slowly excreted through the urinary system. OTA was classified by IARC as a possible human carcinogen, group 2B.

Among the several ochratoxins, OTA is considered to be the most toxic, and it is also the most relevant to food safety. For this reason, it was deemed essential to detect and quantify the concentration of OTA in the beer consumed in Portugal.

The OTA linearities were adequate, with values of R^2 in mobile-phase (2.5 – 25 ng/mL) and in the matrix (0.25 – 2.5 µg/L) of 0.998 and 0.9985, respectively. The value of the matrix effect obtained was 100.05%. Recoveries ranged between 81% and 86%. LOD and LOQ were of 0.14 and 0.43 µg/L, respectively.

The OTA concentration was determined in 33 beer samples, 9 of which (27.27%) were contaminated, with levels ranging between 0.174 and 11.25 µg/L, and an average level of 3.14 µg/L. Two of the homemade beer samples showed considerable concentration levels of 9.21 µg/L and 11.25 µg/L. The samples of industrial made pale ale presented detection frequencies, and levels lower than those of homemade, self-manufactured and craft production beer.

Key words: mycotoxin, ochratoxin A, beer, HPLC-FD.

Índice

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	I
I.1 Micotoxinas.....	2
I.2 Ocratoxina A.....	3
I.2.1 Características físico-químicas.....	6
I.2.2 Toxicocinética	7
I.2.2.1 Absorção.....	7
I.2.2.2 Distribuição.....	8
I.2.2.3 Metabolismo.....	9
I.2.2.4 Excreção	9
I.2.3 Efeitos fisiológicos e toxicidade.....	9
I.2.4 Aspectos legislativos.....	10
I.2.4.1 Limite máximo	11
I.2.4.2 Ingestão diária tolerável/Ingestão semanal tolerável.....	11
I.2.5 Incidência.....	12
I.2.6 Metodologias analíticas	15
2. PARTE EXPERIMENTAL	21
2.1 Materiais e métodos	22
2.1.1 Amostragem	22
2.1.2 Reagentes e materiais.....	22
2.1.3 Soluções.....	23
2.1.4 Aparelhos	23
2.1.5 Cálculo da dose diária estimada.....	24
2.2 Procedimento experimental	24
2.2.1 Extração e purificação de amostras	24
2.2.2 Detecção e Quantificação	26
2.2.3 Ensaio de fortificação:.....	26
2.2.4 Limite de detecção e limite e quantificação	26

2.3 Resultados e Discussão.....	27
2.3.1 Otimização dos procedimentos analíticos.....	27
2.3.2 Desempenho analítico.....	27
2.3.3 Ocorrência da OTA em cerveja.....	31
2.3.4 Ingestão diária estimada da OTA e respectiva avaliação de risco.....	34
Conclusão.....	35
Referências Bibliográficas.....	36
ANEXO.....	41

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Estrutura química da Ocratoxina A.....	6
Figura 1.2 – Cromatograma da OTA numa amostra fortificada a 2 µg/L.....	27
Figura 1.3 – Curva de calibração OTA em fase móvel.....	28
Figura 1.4 – Curva de Calibração em Matriz.....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Fungos produtores de ocratoxina A e condições ótimas de crescimento.....	3
Tabela 1.2 – Figura das diferentes ocratoxinas (adaptado de Anli & Alkis, 2010).....	4
Tabela 1.3 – Resumo da ingestão tolerável de OTA estabelecida por diferentes organizações internacionais	11
Tabela 1.4 – Ocorrência (%) e níveis (ng/L) de OTA em cervejas.....	13
Tabela 1.5 – Metodologias analíticas usadas na determinação de OTA em cervejas	17
Tabela 2.1 – Exatidão dos métodos 1, 2, 3, 4 e 5	29
Tabela 2.2 – Estudo de validação da metodologia analítica para a determinação de OTA em cerveja	30
Tabela 2.3 – Ocorrência de OTA em amostras de cerveja.....	32
Tabela 2.4 – Frequência (%) e teores (µg/L) de OTA em cerveja	33
Tabela 2.5 – Frequência (%) e teores (µg/L) em cervejas loiras de produção industrial e cervejas produzidas de forma artesanal/caseira/de autor	33

LISTA DE ABREVIATURAS

aw – atividade de água

BEN – Balkan Endemic Nephropathy (Nefropatia Endêmica dos Balcãs)

CAS – Chemical Abstract Specification (especificação química)

EFSA – European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

EWI – Estimated Weekly Intake (ingestão semanal estimada)

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FD – Fluorescent Detection (deteção por fluorescência)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

IAC – Immunoaffinity Column (Coluna de imunoafinidade)

IARC – International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional para a Investigação do Cancro)

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LC – Liquid Chromatography (Cromatografia líquida)

LC-MS/MS – Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry (cromatografia líquida com deteção por massa em tandem)

LM – limite máximo

LOD – Limite de deteção

LOQ – Limite de quantificação

ME – *Matrix effect* (efeito da matriz)

MS – Mass Spectrometry (espectrometria de massa)

MS/MS – Tandem Mass Spectrometry (espectrometria de massa em tandem)

NCRI – Negligible Cancer Risk Intake (Ingestão negligenciável de risco de cancro)

ND – Não detetável

OTA – Ocratoxina A

OTB – Ocratoxina B

OTC – Ocratoxina C

OT α – Ocratoxina alfa

p.c. – peso corporal

PTDI – Provisional Tolerable Daily Intake (ingestão diária tolerável provisória)

PTWI – Provisional Tolerable Weekly Intake (ingestão semanal tolerável provisória)

SCF – Scientific Committee of Food (Comité Científico dos Alimentos)

Sp. – specie (espécie)

TDI – Tolerable Daily Intake (ingestão diária tolerável)

TWI – Tolerable Weekly Intake (ingestão semanal tolerável)

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

λ em. – Comprimento de onda de emissão

λ exc. – Comprimento de onda de excitação

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos que causam efeitos tóxicos tais como supressão do sistema imunitário, cancro, defeitos no nascimento, danos no fígado e no tecido nervoso em animais e humanos (Al-Taher *et al.*, 2013).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estima que as micotoxinas afetam anualmente 25% das culturas a nível mundial, resultando em perdas anuais de cerca de 1 bilhão de toneladas de alimentos e produtos alimentares (Al-Taher *et al.*, 2013).

Existem cerca de 300 a 400 micotoxinas, com estruturas muito diversificadas de que resultam diferentes propriedades químicas e físico-químicas. As aflatoxinas e as ocratoxinas são produzidas principalmente por fungos do género *Aspergillus* sp. e as fumonisinas e a zearalenona são produzidas por fungos do género *Fusarium* sp. Estas são as principais micotoxinas que causam uma maior preocupação a nível de saúde pública, devido à sua ocorrência e ao severo impacto na saúde animal e no Homem (Al-Taher *et al.*, 2013).

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer como resultado de condições ambientais durante o crescimento das culturas, bem como de colheitas inadequadas, e mais frequentemente durante o armazenamento e as operações de processamento. A ecologia complexa de crescimento de fungos e produção de micotoxinas pode produzir misturas de micotoxinas em alimentos e rações, especialmente no sector dos cereais (Soto *et al.*, 2014).

Os alimentos mais contaminados com micotoxinas são os cereais, o café, o cacau, as especiarias, as sementes de oleaginosas, as ervilhas secas, os frutos secos, o feijão e as frutas (Lhotská *et al.*, 2016).

Uma vez que a ocratoxina A (OTA) é amplamente encontrada nos cereais, e dado que, as cervejas são produzidas a partir de cereais, estas têm um risco potencial de conter OTA (Anli & Alkis, 2010).

Existe evidência que os alimentos orgânicos contêm frequentemente elevadas concentrações de toxinas naturais produzidas por fungos ou por plantas, enquanto os alimentos produzidos de forma convencional tendem a conter mais compostos sintéticos, como resíduos de pesticidas (Harcz *et al.*, 2007).

Além disso, o uso de fungicidas ou conservantes em quantidades insuficientes pode originar uma situação mais grave devido ao stress provocado nos fungos, levando a uma estimulação da produção de micotoxinas (Harcz *et al.*, 2007).

A exposição a micotoxinas através dos alimentos é um risco para a saúde bastante reconhecido e que está a receber cada vez mais atenção, visto que as micotoxinas são associadas a várias doenças agudas e crónicas em animais e seres humanos em muitas partes do mundo (Harcz *et al.*, 2007). Estas são conhecidas por causar efeitos graves tanto em seres humanos como em animais, através das suas propriedades cancerígenas, teratogénicas, nefrotóxicas e hepatotóxicas e colocam sérios problemas para a segurança alimentar em todo o mundo (Tamura *et al.*, 2011).

Por tudo isto, existe a necessidade de informação em relação à segurança alimentar no sentido de informar os consumidores em relação aos benefícios e aos perigos associados ao consumo de produtos alimentares, a fim de otimizar o impacto na saúde e minimizar os riscos (Harcz *et al.*, 2007).

1.2 Ocratoxina A

As ocratoxinas são um grupo de metabolitos secundários produzidos por alguns fungos tais como *Penicillium verrucosum* (*P. verrucosum*), *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*) e ocasionalmente *Aspergillus niger* (*A. niger*) (Aresta *et al.*, 2006).

Na tabela I encontram-se explicitadas as temperaturas e as atividades de água adequadas ao desenvolvimento de fungos produtores de OTA.

Tabela I.1 - Fungos produtores de ocratoxina A e condições ótimas de crescimento.

Espécies produtoras de OTA	Temperatura ótima (Min-Max) °C	Atividade da água (aw)
<i>A. ochraceus</i>	24-31 (8-37)	0.95–0.99
<i>A. niger</i>	35–37 (6–47)	0.77
<i>P. verrucosum</i>	20 (0–30)	0.80

Fonte: JECFA (2001), Bui-klimke & Wu (2015).

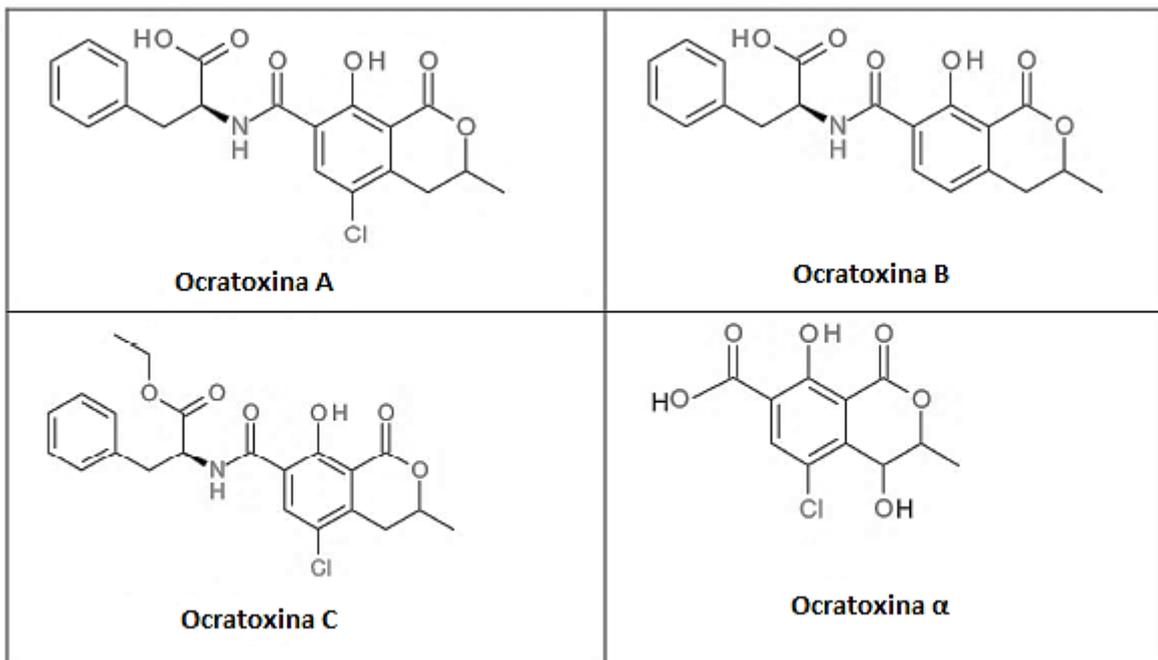
A espécie *A. ochraceus* é responsável pela contaminação de grãos de café verde, enquanto o *P. verrucosum* é responsável maioritariamente pela contaminação de cereais. O *A. niger* é também frequentemente isolado a partir de grãos de café e de uvas, no entanto acaba por contribuir menos para a presença de OTA nestes produtos (Serra *et al*, 2003).

Do grupo das ocratoxinas fazem parte a ocratoxina A (OTA), o seu éster metílico, o seu éster etílico também conhecido como ocratoxina C (OTC), ocratoxina B (OTB) e seus ésteres metílico e etílico, e ocratoxina α (OT α), na qual a porção de fenilalanina está ausente (Anli & Alkis, 2010).

Com exceção da OT α , as ocratoxinas contêm uma porção di-hidroisocumarina derivada de policetídeo ligada através do grupo carboxilo em posição 7 à L-p-fenilalanina por uma ligação amida (Anli & Alkis, 2010).

Na tabela 1.2 encontram-se explicitadas as estruturas das diversas ocratoxinas.

Tabela 1.2 – Figura das diferentes ocratoxinas (adaptado de Anli & Alkis, 2010).



De entre as várias ocratoxinas, a OTA é considerada a mais tóxica, sendo a mais relevante do ponto de vista de segurança alimentar, seguindo-se a ocratoxina C, a ocratoxina B e a ocratoxina α (Anli & Alkis, 2010; Heussner & Bingle, 2015).

A OTA foi isolada laboratorialmente, pela primeira vez, na África do Sul em 1965, a partir do fungo *A. ochraceus* e como um contaminante natural foi encontrada no milho, em 1969, nos EUA (Běláková *et al.*, 2011).

A espécie *P. verrucosum* é a principal produtora de OTA em cereais produzidos em climas temperados, enquanto o *A. ochraceus* está associado ao café, uvas e especiarias em regiões tropicais e em climas mais quentes (Lhotská *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016).

Em relação à produção de OTA, esta depende de vários fatores como a temperatura, a atividade da água e a composição do meio que podem favorecer o crescimento dos fungos. As condições de crescimento, colheita, transporte e conservação podem facilitar a sua produção (Mahdavi *et al.*, 2007).

A OTA foi detetada em várias matrizes alimentares, incluindo bebidas alcoólicas. Dessas matrizes, os cereais são geralmente considerados como representando 50-80% da ingestão de OTA (Anli & Alkis, 2010).

A OTA já foi detetada em outros produtos alimentares como sementes de oleaginosas, café verde, carne, cacau, frutos secos, especiarias, e em bebidas como o vinho, a cerveja e sumos de fruta, em níveis de concentração que dependem do ambiente e das condições de processamento (Aresta *et al.*, 2006; Medina *et al.*, 2006).

A OTA é considerada nefrotóxica, carcinogénica, teratogénica, genotóxica e imunotóxica. Pode originar coagulação do sangue, a inibição da síntese de proteínas, promove a peroxidação da membrana celular, destrói a homeostase do cálcio e inibe a respiração mitocondrial. O seu alvo secundário é o fígado (Mahdavi *et al.*, 2007). Além disso, pode estar implicada na doença humana designada por nefropatia endémica dos Balcãs (BEN) e no desenvolvimento de tumores do trato urinário em seres humanos (Anli & Alkis, 2010).

Devido à sua estabilidade, a OTA consegue resistir ao processamento utilizado na produção de alimentos, como cozer, tostar e fermentar (Novo *et al.*, 2013).

A Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) classificou esta micotoxina como cancerígeno renal para os animais e possível agente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2B) (Medina *et al.*, 2006).

1.2.1 Características físico-químicas

A fórmula empírica da OTA é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ e o peso molecular é de 403,82 g/mol. De acordo com a IUPAC, a OTA é L-fenilalanina-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirran-7-il)carbonil]-(R)isocoumarina (Anli & Alkis, 2010) (Figura 1.1).

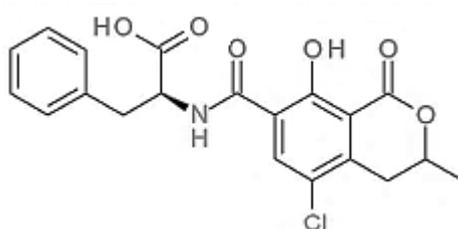


Figura 1.1 – Estrutura química da ocratoxina A.

O número CAS (*chemical abstract specification*) da OTA é 303-47-9 (Monaci & Palmisano, 2004; Anli & Alkis, 2010).

É um composto cristalino incolor, com fluorescência azul à luz ultravioleta e possui a característica de ácido fraco (Monaci & Palmisano, 2004; Anli & Alkis, 2010).

É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, ligeiramente solúvel em água e solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio (Monaci & Palmisano, 2004; Anli & Alkis, 2010).

Os pontos de fusão são 90 e 171 °C, quando recristalizados a partir de benzeno ou xileno, respectivamente (Monaci & Palmisano, 2004; Anli & Alkis, 2010).

A OTA comporta-se como um ácido fraco. Possui valores de pKa entre 4,2-4,4, para o grupo carboxílico da porção fenilalanínica, e entre 7,0-7,3, devido ao grupo hidroxilo da parte isocumarínica. O pKa diminui quando existem mais de 3 unidades ligadas ao soro de albumina (Monaci & Palmisano, 2004; Anli & Alkis, 2010).

1.2.2 Toxicocinética

Os dados cinéticos para os ratos indicam que as diferenças de estirpe, género e idade na cinética de OTA podem explicar as diferentes sensibilidades de género e espécie relativamente à OTA. No caso dos humanos, os dados disponíveis são bastante limitados, no entanto, género, estação do ano e a localização geográfica parecem ser os fatores mais importantes (Heussner & Bingle, 2015).

Os fatores de toxicocinética (as alterações das concentrações de um composto no organismo ao longo do tempo) e toxicodinâmica (as interações dinâmicas de um composto com alvos biológicos e seus efeitos biológicos) determinam a toxicidade da OTA (Ringot et al., 2006).

A OTA depois de absorvida no trato gastrointestinal liga-se às proteínas de soro principalmente à albumina. A reabsorção de OTA a partir do intestino volta para a circulação, como consequência da reciclagem biliar, favorecendo a redistribuição sistémica de OTA para os diferentes tecidos. Ocorre acumulação de OTA no sangue, fígado e rim. Os principais órgãos de biotransformação da OTA são o fígado e os rins. Em todas as espécies, as excreções fecais e as urinárias desempenham papéis importantes na depuração plasmática da toxina. Tanto que a excreção de leite de mamíferos parece ser relativamente eficaz (Ringot et al., 2006).

1.2.2.1 Absorção

Após a ingestão de alimentos contaminados e absorção pelo trato gastrointestinal, a OTA passa para o soro sanguíneo humano e liga-se a proteínas séricas. Existe uma variação na semi-vida do soro entre as espécies e sabe-se que esta é dependente da afinidade e grau de ligação às proteínas. O tempo de meia-vida pode atingir aproximadamente 35 dias no soro humano, sendo um risco acrescido para os humanos pois é um tempo superior verificado ao de outras espécies, tais como o ratinho (40h), o rato (55-230h) e o porco (72-120h). A reabsorção da OTA do intestino de volta à circulação, como consequência da reciclagem biliar, favorece a redistribuição sistémica da OTA para os diferentes tecidos. Além disso, a reabsorção de OTA ocorre nos túbulos proximal e distal do rim e a acumulação ocorre no sangue, fígado e rim. O fígado e os rins são também os principais órgãos de biotransformação da OTA (Anli & Alkis, 2010).

Na maioria das espécies animais, a OTA é passivamente absorvida a partir do estômago e, em particular, do jejuno proximal. A absorção passiva é altamente favorecida pela elevada afinidade de ligação da OTA para as proteínas do plasma, retardando assim a eliminação da micotoxina pelo organismo, aumentando o seu tempo de semi-vida. A percentagem de OTA absorvida difere entre espécies: 66% em suínos, 56% em ratos e coelhos e 40% no tecido muscular do frango. Posteriormente, a OTA é transportada através do sistema portal e distribuída para diferentes tecidos e órgãos (Ringot *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Distribuição

A OTA liga-se fortemente às proteínas. Uma vez que atinge a corrente sanguínea, 99% liga-se às proteínas séricas principalmente à albumina, o que facilita a sua absorção passiva na forma não ionizada e explica a sua meia-vida longa no organismo. Segundo alguns estudos *in vivo*, o tempo de vida de OTA em sistemas vivos é dependente da presença de albumina do soro e esta ligação depende da espécie e do sexo (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Nos animais, a concentração da toxina e dos seus metabolitos nos tecidos e no plasma depende de importantes factores como a espécie animal, a dose administrada, a forma de administração da OTA, a composição da dieta, bem como do estado de saúde do animal (Ringot *et al.*, 2006).

A semi-vida de eliminação da OTA é mais longa no sangue do que nos tecidos e está relacionada com a maior afinidade de ligação da micotoxina às proteínas do sangue (Ringot *et al.*, 2006).

A distribuição nos tecidos de porco, rato, frango e cabra segue uma das seguintes ordens: rim> fígado> músculo> gordura ou rim> músculo> fígado>>gordura (Ringot *et al.*, 2006).

Nos seres humanos, a concentração de OTA no soro fetal foi relatada como sendo duas vezes superior à da mãe, indicando assim uma transferência placentária ativa. Existem também factores genéticos, ambientais e patológicos que podem contribuir para o transporte placentário de OTA, sendo que estes facilitam o fornecimento dos compostos essenciais ao feto em desenvolvimento (Ringot *et al.*, 2006).

1.2.2.3 Metabolismo

O metabolismo da OTA não foi elucidado em pormenor e, actualmente, os dados relativos à biotransformação da OTA são controversos (Anli & Alkis, 2010).

Nos seres humanos, a ocratoxina A é metabolizada muito lentamente com um tempo de semi-vida superior a 30 dias, e de rápida absorção. Estudos sobre os mecanismos dos efeitos da OTA sobre a vida nos organismos demonstraram a inibição da síntese de proteínas e o aumento de peroxidação lipídica. Causa danos no metabolismo dos sacarídeos e do cálcio e nas funções mitocondriais (Běláková *et al.*, 2011).

1.2.2.4 Excreção

A OTA é um composto tóxico cumulativo com rápida absorção e eliminação lenta. Em todas as espécies, tanto as excreções fecais como as urinárias, desempenham papéis importantes na depuração plasmática da toxina. Além das vias de excreção renal e fecal, a excreção de leite dos mamíferos parece ser relativamente eficaz, no entanto, isso tem efeitos perigosos para os bebés (Anli & Alkis, 2010; Ringot *et al.* 2006).

Uma vez que a OTA é caracterizada por potencial ligação a uma proteína plasmática, a sua filtração glomerular é limitada. A OTA sofre uma eliminação tubular para a urina e o seu metabolito OT α é excretado nas fezes. A excreção fecal deve-se à excreção biliar, que é muito eficiente, o que pode estar relacionado com o peso molecular de OTA. A reabsorção de OTA filtrada e excretada retarda a sua excreção e pode levar à acumulação da toxina no tecido renal e assim contribuir para a sua toxicidade renal (Ringot *et al.*, 2006).

1.2.3 Efeitos fisiológicos e toxicidade

A OTA é a principal micotoxina do grupo das ocratoxinas e constitui a maior preocupação a nível toxicológico. Como já foi referido anteriormente, foi demonstrado que a OTA é nefrotóxica, hepatotóxica, teratogénica e imunotóxica para várias espécies de animais. Além disso, pode estar implicada na doença humana Nefropatia Endémica dos Balcãs (BEN) e no desenvolvimento de tumores do sistema urinário em seres humanos (Aresta *et al.*, 2006; Anli & Alkis, 2010).

Os efeitos primários da toxicidade da OTA são a inibição da fenilalanina-t-RNA-sintetase, a inibição da respiração mitocondrial e a perturbação na homeostase do cálcio intracelular que é inerente ao processo de peroxidação lipídica (Monaci & Palmisano, 2004). Para além destes efeitos, também são encontrados outros, tais como a coagulação sanguínea, a inibição de síntese de proteínas e a promoção da peroxidação da membrana celular (Anli & Alkis, 2010).

De referir que esta micotoxina quando ingerida é muito persistente no homem, devido à sua fraca eliminação, sendo o tempo de semi-vida de 35 dias no sangue. A OTA não é armazenada ou depositada, mas distribuída de forma heterogénea, causando assim, danos principalmente nos rins, sendo o fígado o seu órgão alvo secundário (Monaci & Palmisano, 2004).

A OTA está envolvida em patologias severas dos rins e possivelmente ligada a tumores do tracto urinário (Aresta *et al.*, 2006).

Suspeita-se que o consumo de alimentos contaminados com OTA durante a gravidez ou na infância cause lesões no DNA a nível testicular que se manifestam na puberdade, promovendo o cancro nos testículos (Monaci & Palmisano, 2004).

1.2.4 Aspetos legislativos

A implementação da legislação obriga os agentes económicos a controlar a presença de certas micotoxinas em alguns alimentos e impede a comercialização dos produtos contaminados com valores acima dos regulamentados.

Dado que a ocratoxina A está presente em diversos produtos alimentares, diversos países têm adotado regulamentação adequada, com o objetivo de proteger os consumidores contra os efeitos da OTA. A implementação da legislação juntamente com o controlo dos fatores que levam à formação desta micotoxina são elementos importantes para garantir que o consumidor está protegido.

1.2.4.1 Limite máximo

O limite máximo (LM) de OTA estabelecido pela União Europeia é de 5,0 µg/kg para os cereais, 3,0 µg/kg para os produtos derivados de cereais, 5,0 µg/kg para o café torrado, 2,0 µg/L para o vinho (EC-Nº 1881/2006) e 15 µg/kg para as especiarias (EC-Nº 105/2010).

Embora não exista limite definido para a cerveja, foi estabelecido pela União Europeia um máximo de 3 µg/kg para o malte (Medina *et al.*, 2006). Contudo, existem níveis de orientação estabelecidos na Holanda (0,5 µg/L), na Finlândia (0,3 µg/L) e em Itália (0,2 µg/L) (Aresta *et al.*, 2006).

1.2.4.2 Ingestão diária tolerável/Ingestão semanal tolerável

Na tabela 1.3 encontram-se disponíveis os diferentes valores de ingestão diária tolerável (TDI), ingestão diária tolerável provisória (PTDI), ingestão semanal tolerável (TWI) e ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) estabelecidos por diferentes organizações e investigadores ao longo do tempo para a OTA.

Tabela 1.3 - Resumo da ingestão tolerável de OTA estabelecida por diferentes organizações internacionais (adaptado de Bui-Klimke & Wu, 2015).

Organização	Métrica de ingestão tolerável	Ingestão diária/semanal	Referências
EFSA	TWI	120 ng/kg p.c./semana	EFSA, 2006
Health Canada	PTDI	3 ng/kg p.c./dia	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 2010
Health Canada	NCRI	4 ng/kg p.c./dia	Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 2010
FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	PTWI	100 ng/kg p.c./semana	JECFA, 2007
Nordic Expert Group on Food Safety	TDI	5 ng/kg p.c./dia	Olsen <i>et al.</i> , 1991
Scientific Committee of Food (SCF) of the European Union	TDI	5 ng/kg p.c./dia	EFSA, 2006

1.2.5 Incidência

A cevada é a principal matéria-prima utilizada na elaboração da cerveja. Aquela tende a ser inoculada com leveduras durante o processo de armazenamento ou maltagem. Sabe-se que aumentar a humidade e a a_w da cevada cria condições adequadas para o crescimento de fungos. Desta forma, os cereais têm de ser cuidadosamente monitorizados para evitar odores indesejados que podem afetar o aroma da cerveja (Anli & Alkis, 2010).

A fermentação alcoólica e a produção de cerveja ajudam a reduzir a quantidade de micotoxinas no produto final. Alguns autores referiram que a OTA presente na cevada passa para a cerveja atingindo uma redução de 14-18%. Verificaram ainda que a OTA na cevada diminui 14-28%, quando esta foi usada na produção de cerveja, e 70% da OTA foi degradada nas etapas de produção. Por fim, notaram que a OTA que passa do malte para a cerveja sofre uma redução de 10%. Na produção de cerveja, aquando da trituração do grão, foram observadas perdas substanciais de OTA (40-89%) devido à degradação proteolítica. Quanto à fermentação, as diminuições da OTA variam entre 2-69% (Anli & Alkis, 2010).

Na tabela 1.4 apresentam-se os dados de vários estudos, tais como a ocorrência (%) e os níveis (ng/L) de OTA detetados em cervejas provenientes de vários países. O valor médio do teor de OTA varia entre 20 ng/L e os 1470 ng/L, para as amostras analisadas na Turquia e na Alemanha, respetivamente. Os valores mínimos e máximos variam entre 12-45ng/L e 1500-2340000 ng/L em amostras da Turquia e da África do Sul, respetivamente.

No que respeita à frequência de deteção, verificou-se uma frequência de 100% em amostras recolhidas em países como a Espanha, a Hungria, a Itália, o Irão, a Alemanha e a República Checa. A menor ocorrência de OTA foi encontrada em países como o Brasil (0-5,3%) (Kawashima *et al.*, 2007), a China (0%) (Wu *et al.*, 2011), a Coreia (4,3%) (Park *et al.*, 2005), o Japão (0%) (Tamura *et al.*, 2011) e a Turquia (14%) (Kabak, 2009).

Tabela 1.4 – Ocorrência (%) e níveis (ng/L) de OTA em cervejas.

País	Tipo de amostra	N.º de amostras	Frequência (%)	Teores (ng/L)		Bibliografia
				Min-Máx	Média ± SD	
África do Sul	Cerveja	35	15 (43%)	1500-2340000	-	Odhav & Naicker, 2002
Alemanha	Cerveja	3	3 (100%)	1170-5560	1470	Reinsch <i>et al.</i> , 2007
Bélgica	Cerveja	62	51 (82%)	10-185	33 ± 37	Tangni <i>et al.</i> , 2002
Brasil	Cerveja Loura	94	5 (5,3%)	1000 – 18000	-	Kawashima <i>et al.</i> , 2007
Brasil	Cerveja preta	29	0 (0%)	-	-	Kawashima <i>et al.</i> , 2007
China	Cerveja	20	0	-	-	Wu <i>et al.</i> , 2011
Coreia	Cerveja	46	2 (4,3%)	200-300	-	Park <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Cerveja	31	24 (77%)	205	-	Soto <i>et al.</i> , 2014
Espanha	Cerveja	88	73 (82,9%)	7 – 204	44	Medina <i>et al.</i> , 2005
Espanha	Cerveja	69	69 (100%)	8-498	70	Medina <i>et al.</i> , 2006
Europa	Cerveja	106	72 (67,9%)	2-189	19 ± 29	Bertuzzi <i>et al.</i> , 2011
Hungria	Cerveja	25	25 (100%)	30 – 250	130	Soto <i>et al.</i> , 2014
Itália	Cerveja	30	5 (16,7%)	<200	-	Soto <i>et al.</i> , 2014
Itália	Cerveja	2	2 (100%)	-	-	Novo <i>et al.</i> , 2013
Itália	Cerveja	30	5 (16,6%)	-	-	Prelle <i>et al.</i> , 2013
Irão	Cerveja	35	35 (100%)	0,50-524,5	96 ± 126	Mahdavi <i>et al.</i> , 2007

Tabela 1.4 – Ocorrência (%) e níveis (ng/L) de OTA em cervejas (continuação).

País	Tipo de amostra	N.º de amostras	Frequência (%)	Teores (ng/L)		Bibliografia
				Min-Máx	Média ± SD	
Japão	Cerveja	24	0	-	-	Tamura <i>et al.</i> , 2011
República Checa	Vários tipos cerveja	115	45 (39%)	1-243,8	-	Belakova, 2011
República Checa	Cerveja Regular e Cerveja Lager	12	91% 100%	20-180 65-260	64	Ostry <i>et al.</i> , 2015
República Checa	Loura	36	100%	20-1200	70	Lhotská <i>et al.</i> , 2016
	Preta	7	100%	LOD – 10	30	
	Trigo	6	100%	20-50	40	
Rússia e Bélgica	Cerveja Loura e Preta	37	4 (10,8%)	120-490	-	Goryacheva <i>et al.</i> , 2008
Turquia	Cerveja	35	5 (14%)	12-45	20 ± 14	Kabak, 2009
Vários	Cerveja Loura e Vermelha	49	6 (12%)	2700-6900	-	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Vários	Cerveja	35	35 (100%)	0,90-228,60	60 ± 47	Mahdavi <i>et al.</i> , 2007
Vários	Cerveja Vermelha	10	1 (10%)	510	-	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Vários	Cerveja Loura “ale”	10	1 (10%)	3200	-	Rubert <i>et al.</i> , 2013
Vários Importada	Cerveja	76	0	-	-	Al-Taher <i>et al.</i> , 2013
Vários Importada	Cerveja	10	5 (50%)	250 -270	250 ± 20	Aresta <i>et al.</i> , 2006
Vários Importada	Cerveja	20	17 (85%)	12 – 87	32 ± 26	Tangni <i>et al.</i> , 2002

1.2.6 Metodologias analíticas

As metodologias analíticas a usar para avaliar os níveis de OTA nos alimentos são fundamentais, pois terão que ser específicas, sensíveis, precisas e reprodutíveis para os controlar, fazendo assim cumprir os limites legais.

Nos métodos analíticos é necessário proceder de forma sequencial a uma correta amostragem, à preparação da amostra recolhida, à extração/purificação da amostra e ainda à deteção e quantificação da OTA.

Na tabela 1.5 estão descritos diversos métodos analíticos usados em determinação de OTA em cerveja, investigados por vários autores.

Na etapa de extração/purificação, a maioria dos investigadores recorre a colunas de imunoafinidade (IAC) (Belákova *et al.*, 2011; Bertuzzi *et al.*, 2011; Goryacheva *et al.*, 2008; Kabak, 2009; Kawashima *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2005, 2006; Park *et al.*, 2005; Prelle *et al.*, 2013; Tangni *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011). São colunas que contêm anticorpos e demonstram ser altamente sensíveis e seletivas que permitem extrações e purificações das amostras com maior rigor. Outros investigadores optam pela extração líquido-líquido com água-acetonitrilo (Al-Taher *et al.*, 2013), clorofórmio (Medina *et al.*, 2005; Odhav e Naicker, 2002; Sáez *et al.*, 2004) ou solução de amónia, metanol, água e ácido clorídrico (Reinsch *et al.*, 2007).

Na etapa de purificação alguns investigadores optam por usar, em alternativa às colunas IAC, colunas C18 (Lhotská *et al.*, 2016; Tamura *et al.*, 2011; Sáez *et al.*, 2004) e colunas Oasis HLB (Sáez *et al.*, 2004; Rubert *et al.*, 2013; Ventura *et al.*, 2006).

Quanto à etapa final do processo que envolve a determinação qualitativa e quantitativa da OTA têm sido vários os métodos analíticos usados. A maioria dos investigadores recorre a métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência (HPLC-FD) (Bertuzzi *et al.*, 2011; Kabak, 2009; Kawashim *et al.*, 2007; Ostry *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2011), HPLC com deteção por massa (Park *et al.*, 2005; Prelle *et al.*, 2013; Reinsch *et al.*, 2007; Rubert *et al.*, 2013). Outros autores optaram por usar métodos ELISA (Mahdavi *et al.*, 2007; Novo *et al.*, 2013), UPLC/MS/MS (Al-Taher *et al.*, 2013; Belakova *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2011).

Na LC-FD os comprimentos de onda de excitação e emissão variaram entre 332 e 335 nm (Aresta *et al.*, 2007) e 460 e 497 nm (Lhotská *et al.*, 2016), respetivamente.

Em relação à fase móvel, os solventes mais usados têm sido o acetonitrilo, a água e o ácido acético, no entanto as proporções dos diferentes solventes foram diversas (Aresta *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 2004; Tagni *et al.*, 2002). Outras opções são o recurso à mistura água/metanol (Ventura *et al.*, 2006), acetonitrilo/água (Belakova *et al.*, 2011), acetonitrilo e ácido ortofosfórico (Odhav & Naicker, 2002), metanol-solução aquosa de ácido acético (Lhotská *et al.*, 2016).

Tabela 1.5 – Metodologias analíticas usadas na determinação de OTA em cervejas.

Tipo de cerveja	Extração/ Purificação	Deteção e Quantificação	Fase Móvel	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
Cerveja	Clorofórmico e sulfato de sódio	HPLC – FD - λ exc: 333 nm - λ em: 470 nm - coluna: C18	Acetonitrilo: ácido ortofosfórico a 0,1% (1:1)	1000	-	Odhav & Naicker. 2002
Cerveja	SPE-Oasis MAX	LC-MS/MS - coluna: Inertsil ODS 3 (tamanho de partícula 5 μ m)	Metanol/água/ácido acético (70/30/1,5 v/v)	400	800	Reinsch <i>et al.</i> , 2007
Cerveja	IAC	HPLC-FD - λ exc: 332 nm - λ em: 462 nm - coluna: C18 (15 cm X 4,0 m)	Acetonitrilo/água/ácido acético (45:54:1 v/v/v)	3	10	Tangni <i>et al.</i> , 2002
Cerveja loura e preta	IAC	HPLC-FD - λ exc: 333 nm - λ em: 470 nm - coluna: C18 (100 x 4,6 mm)	Ácido acético/metanol (35:65)	100	500	Kawashima <i>et al.</i> , 2007
Cerveja	IAC	HPLC-FD: - coluna: SB-C18 (4,6 x 50mm); LC-MS-MS - Coluna: C18 (50 x 2,1 mm)	Acetonitrilo/água/ácido acético (45:54:1 v/v/v) Água/acetonitrilo (30:70 v/v)	5	20	Wu <i>et al.</i> , 2011
Cerveja	IAC	HPLC-FD - λ exc: 330 nm, - λ em: 440 nm - coluna: C18 150 mm x 3,9 mm, 5 μ m)	Acetonitrilo/água/ácido acético (57:43:2 v/v/v)	200	-	Park <i>et al.</i> , 2005
		HPLC-MS/MS - coluna: ODS 30 (250 mm x 2 mm, 5 μ m)	Acetonitrilo/metanol/água (1:1:1 v/v/v)			

Tabela 1.5 – Metodologias analíticas usadas na determinação de OTA em cervejas (continuação).

Tipo de cerveja	Extração/Purificação	Deteção e Quantificação	Fase Móvel	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
Cerveja	Precipitação com hidroxiacetato de chumbo Acidificação do sobrenadante com ácido fosfórico a pH 2,8-3 Extração com clorofórmio IAC	LC-FD - coluna: C18 (250 mm x 4 mm, tamanho de partícula 5 µm)	Acetonitrilo/água/ácido acético (99: 99: 2 v/v/v), acetoneitrilo/água/ácido acético (50: 49: 1 v/v/v)	5	-	Medina <i>et al.</i> 2005
Cerveja	SPE-silica	LC-MS - coluna: C18 (150 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm)	Acetonitrilo/água/ácido acético (44:56:1 v/v/v)	0,8	2,5	Medina <i>et al.</i> 2006
Cerveja	IAC	HPLC-FD λ exc: 330 nm, λ em: 440 nm	Acetonitrilo/solução aquosa de ácido acético a 2% (gradiente de 35:65 a 67:33)	2	5	Bertuzzi <i>et al.</i> 2011
Cerveja	Extração líquido/líquido	ELISA	-	73-270	-	Novo <i>et al.</i> , 2013
Cerveja	IAC	HPLC-FD - coluna: Synergi 4 µ Hydro-RP (250 mm x 4,6 mm) LC-MS - coluna: Synergi Fusion RP (100 mm x 4,6 mm)	Acetonitrilo/ água/ ácido acético (49:49:2 v/v/v) Acetonitrilo/água/ácido acético (50:50:0.1 v/v/v)	80	260	Prelle <i>et al.</i> , 2013
Cerveja	Bicarbonato de sódio Ácido Clorídrico Diclorometano	ELISA	-	25	-	Mahdavi <i>et al.</i> , 2007

Tabela 1.5 – Metodologias analíticas usadas na determinação de OTA em cervejas (continuação).

Tipo de cerveja	Extração/ Purificação	Deteção e Quantificação	Fase Móvel	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
Cerveja	Acetonitrilo SPE: PSA/C18	UHPLC/MS/MS - Coluna: C18 1,7 µm, 2.1 × 50 mm)	Ácido acético (2%) – acetato de amónio 0,1 mM-metanol	-	1000	Tamura <i>et al.</i> , 2011
Cerveja	IAC	UPLC - coluna: HSS T3 (2.1 × 100 mm, 1,8 µm) HPLC/ITP/MS - Coluna: PFP (3,0 × 100 mm, 2,6 µm)	Acetonitrilo/água (70:30 v/v)	0,3	1	Belakova <i>et al.</i> , 2011
Cerveja regular e lager	-	HPLC-FLD	-	-	10	Ostry <i>et al.</i> , 2015
Cerveja loura, preta e trigo	SPE – C18 Filtração em filtros PTFE (0,45 µm)	HPLC-FD - λ exc: 335 nm, - λ em: 497nm - coluna: C18 (5 × 4,6 mm), tamanho da partícula 2,7 µm	Metanol/sol. aquosa ác. acético a 0,5% pH=2,8 (30:70 v/v)	3	10	Lhotská <i>et al.</i> , 2016
Cerveja	IAC	ELISA HPLC-FL	-	50	-	Goryacheva <i>et al.</i> 2008
Cerveja	IAC	HPLC-FD - λ exc: 333 nm, - λ em: 470 nm - coluna: C18 (25 × 4,6 mm)	Acetonitrilo/água/ ácido acético (47:51:2 v/v/v)	10	30	Kabak. 2009
Cerveja	SPE Oasis HLB	HPLC/MS/MS - coluna: C18 (150 mm, 2 mm, 5 µm)	Fase A: água, formato de amónio 5 mM e ácido fórmico a 0,1% Fase B: metanol e formato de amónio 5 mM	750- 1000	2500- 3000	Rubert <i>et al.</i> 2013

Tabela 1.5 – Metodologias analíticas usadas na determinação de OTA em cervejas (continuação).

Tipo de cerveja	Extração/ Purificação	Deteção e Quantificação	Fase Móvel	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
Cerveja nacional e importada	Água e Acetonitrilo (30:70, v/v)	UHPLC-MS/MS	Fase A: ácido fórmico a 0,1% em água;	100	1000	Al-Taher <i>et al.</i> , 2013
		LC-MS/MS - coluna: C18 (100 mm × 2,1 mm, 2,7 µm)	Fase B: ácido fórmico a 0,1% em metanol. Ambas as fases contêm formato de amónio 5mM.			
Cerveja	Extração: SPME Purificação: IAC	LC-FD - λ exc: 332 nm - λ em: 460mm - coluna: LC-18 DB (150 × 4,6 mm)	Água/acetoneitrilo/ácido acético (111:87:2 v/v/v)	1	53	Aresta <i>et al.</i> , 2006
		LC-FLD - λ exc: 332 nm - λ em: 460mm - coluna: C18 (250mm × 4 mm, 5 µm)	Acetonitrilo/água/ácido acético (99:99:2 v/v/v)	-	1000	Sáez <i>et al.</i> , 2004
Cerveja	SPE – IAC SPE Oasis HLB	UPLC/MS/MS - coluna C18 (2,1 × 50 mm, 1,7µm)	Água/metanol (40:60 v/v)	100	200	Ventura <i>et al.</i> , 2006

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e métodos

2.1.1 Amostragem

O estudo foi realizado em Coimbra no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Nesta investigação, foram estudadas um total de 33 amostras de cerveja. Destas 31 eram cervejas loiras e 2 eram cervejas pretas. Foram recolhidas em diferentes supermercados da zona centro do país. As amostras são produzidas em diversos países da Europa (Anexo).

2.1.2 Reagentes e materiais

Os reagentes de grau HPLC utilizados foram o acetonitrilo (Carlos Erba, Milão, Itália) e o metanol (grau de pureza $\geq 99.9\%$, Chrosmasolv, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). O ácido acético glacial foi obtido da Panrec Química (Sal, Barcelona, Spain). O tolueno de grau p.a. foi obtido da E. Merck, Estocolmo. A água foi obtida diariamente do sistema Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

Para o pré-tratamento da amostra foram utilizados os seguintes reagentes: o acetato de zinco (Riedel-de-Haën, Sigma-Aldrich), o hidróxido de sódio e o bicarbonato de sódio (Pronolab, José M. Vaz Pereira, S.A.).

No processo de filtração foram usados papel de filtro microfibras de vidro (150 mm, Munktell & Filtrak GmbH, Barenstein, Alemanha), papel de filtro nitrato de celulose (0,45 μm , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemanha) e filtros de membrana de poliamida (0,2 μm , Whatman GmbH, Dassel, Alemanha). Para a filtração do extrato seco reconstituído foram usados filtros de membrana (Durapore, 0,22 μm ; Milipore).

Foram usadas colunas de extração em fase sólida (SPE) Oasis HLB obtidas da Waters (Irland) e colunas de imunoafinidade (IAC) OchraTest™ (VICAM, Milford, USA).

2.1.3 Soluções

A solução tampão fosfato (PBS) foi preparada com 0,2 g de cloreto de potássio, 0,2 g de di-hidrogeno fosfato de potássio, 1,2 g de hidrogeno fosfato disódico anidro e 8 g de cloreto de sódio adicionados a 900 mL de água destilada. Após dissolução o pH foi ajustado a 7,4 com ácido clorídrico 0,1 M ou com hidróxido de sódio 0,1 M. O volume da solução foi completado para 1 L de água.

A fase móvel constituída por uma mistura de ACN:H₂O:CH₃COOH (49,5:49,5:1) foi filtrada através de filtros de membrana de poliamida de 0,2 µm. Todas os reagentes de cromatografia líquida foram desgaseificados durante 15 min por ultrassons.

A solução stock do padrão de OTA foi preparada a 250 µg/mL, por diluição com tolueno:ácido acético (49,5:0,5 v/v).

A solução intermédia foi preparada por diluição da solução padrão a 10 µg/mL com tolueno:ácido acético (49,5:0,5 v/v). As soluções de trabalho foram preparadas entre 0,5 – 10 ng/mL em fase móvel, por diluição da solução intermédia.

As soluções padrão para a curva de calibração em fase móvel foram preparados entre 2,5 e 25 µg/L (2,5; 5; 10; 20; 25 µg/L).

As concentrações para a curva de calibração na matriz foram preparadas entre 0,25 e 2,5 µg/L (0,25; 0,5; 1; 2; 2,5 µg/L).

2.1.4 Aparelhos

Os aparelhos usados foram os seguintes:

- SPE de Aschcroft (Stratford, CT, USA) ligado a um coletor de vácuo de Macherey-Nagel (USA).
- Bomba Dinko (mol. D-95, 130W, 220V).
- Evaporador RapidVap Vertex™ de LabConco (Kansas City, MO, USA).
- Banho ultrassónico Sonorex RK 510S (Berlin, Germany).

- Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Modelo 805, bomba 305, com um loop de 20 µL da Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France) equipado com uma coluna analítica Chromolith® Performance RP-18 e uma coluna de proteção (10x4,6 mm) (Darmstadt, Alemanha). O detector fluorimétrico (FD) (Jasco (Japão) FP-2020 Plus) usado operou com λ de excitação de 333 nm e λ de emissão de 460 nm.

2.1.5 Cálculo da dose diária estimada

A ingestão diária estimada foi calculada através da seguinte equação $EDI = (\sum c \times C) / (N \times D \times K)$, sendo que $\sum c$ é a soma da concentração de OTA em estudo nas amostras analisadas (µg/L), C é a ingestão média anual estimada por pessoa, N é o número de amostras analisadas, D é o número de dias do ano, K é o peso corporal. Segundo a Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja, a última avaliação de consumo em Portugal corresponde a 2011 sendo de 53 L/habitante. O peso médio corporal dos adultos em Portugal foi considerado 69 Kg (Arezes *et al.*, 2006).

2.2 Procedimento experimental

Foram avaliadas cinco metodologias analíticas, uma que envolveu injeção direta, três em que a extração em fase sólida ocorreu recorrendo a colunas SPE Oasis HLB e uma foi executada com colunas de imunoafinidade. A deteção e quantificação da OTA nas amostras de cerveja foram efetuadas por HPLC – FD.

Em todas as metodologias, a cerveja foi previamente degaseificada durante 45min e filtrada por 3 filtros (papel de micro fibra de vidro, filtro de 0,45 µm e por fim pelo filtro de 0,2 µm), reduzindo assim o número de interferentes na amostra quando esta passa pelas colunas.

2.2.1 Extração e purificação de amostras

Método I

A amostra em branco e a amostra fortificada a 2 µg/L foram injetadas diretamente no sistema HPLC-FD.

Método 2

Dez mililitros de amostra foram adicionados a 40 mL de água Mili-Q. As colunas Oasis HLB foram acondicionadas com 5 mL de metanol e com 5 mL de água. Posteriormente, a amostra diluída (10 mL) foi passada pela coluna a uma velocidade induzida por vácuo de 1 gota por segundo. De seguida as colunas foram lavadas com 5 mL de água e eluídas com 5 mL de metanol. O eluído foi seco em evaporador a 40 °C, sob um fluxo de azoto suave, e o extrato seco foi armazenado a -20°C. Antes da injeção no cromatógrafo, o extrato seco foi redissolvido em 1000 µL de fase móvel e foi microfiltrado.

Método 3

Foi efetuado um procedimento igual ao método 2, mas em vez de acondicionamento com 5 mL de metanol, foram usados 5 mL de HCl 0,1N, e a lavagem da coluna foi feita com 2 mL de água em substituição dos 5 mL.

Método 4

Foram adicionados 100 µL de hidróxido de sódio e 0,3 mL de solução aquosa de acetato de zinco a 25%, como pré-tratamento, a 10 mL de cerveja. Posteriormente, a mistura foi submetida a centrifugação a 5500 rpm por 10 minutos e a 5° C. O sobrenadante foi colocado em colunas Oasis HLB, de acordo com o método 2.

Método 5

A 10 mL de amostra de cerveja foram adicionados 1,25ml de bicarbonato de sódio a 4% e 10 mL de PBS. De seguida procedeu-se à centrifugação a 5500 rpm. A amostra foi passada nas colunas IAC's a uma velocidade induzida por vácuo de 1 gota por segundo. Posteriormente, as colunas foram lavadas com 10 mL de água Mili-Q e eluídas com 4 mL de metanol. O eluído foi seco no evaporador a 40 °C, sob um fluxo de azoto suave, e o extrato seco foi armazenado a -20 °C. Antes da injeção no cromatógrafo, o extrato seco foi redissolvido em 1000 µL de fase móvel e foi microfiltrado.

2.2.2 Detecção e Quantificação

A análise das amostras de cerveja foi efetuada por cromatografia líquida com detecção de fluorescência e foi utilizado um volume de injeção de 20 µL, com a fase móvel fluindo a 1 ml/min. Os comprimentos de onda usados foram 333 nm, para excitação, e 460 nm para a emissão.

A identificação da OTA foi obtida através da comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos das amostras com as do padrão.

2.2.3 Ensaio de fortificação:

Os ensaios de fortificação foram efetuados a três níveis distintos, 0,5, 1 e 2 µg/L. Para o efeito utilizaram-se soluções padrão com concentração de 5, 10 e 20 ng/mL, das quais foi adicionado 1 mL a 10 mL de cerveja, tendo sido efetuados três replicados para cada nível de fortificação. Através destes ensaios foram obtidas as percentagens de recuperação, sendo assim possível avaliar a exatidão do método para cada um dos três níveis de fortificação. A precisão do método foi analisada através da repetibilidade intra e inter-dia.

2.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) são determinados mediante o sinal-ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular e por processos estatísticos. O sinal-ruído só pode ser aplicado para processos analíticos que apresentem ruído de linha de base. Efetua-se a determinação da razão por comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco que estabelece a concentração mínima na qual o analito pode ser detetado (LOD) ou quantificado (LOQ). O LOD e o LOQ foram determinados como três e dez vezes o ruído do nível mais baixo detetado e determinado, respetivamente.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Otimização dos procedimentos analíticos

No processo de filtração foram utilizados três filtros diferentes, o que tornou o processo mais eficiente pois reduziu o número de interferentes da amostra quando esta passou na coluna. Para a otimização do método foi utilizado a cromatografia líquida com detetor por fluorescência (LC-FD) usando uma fase móvel constituída por acetonitrilo:água:ácidoacético (49,5:49,5:1), com uma proporção de fluxo de 1,0 mL/min.

A figura seguinte (Figura 2.1) apresenta um cromatograma de uma amostra fortificada (2 µg/L).

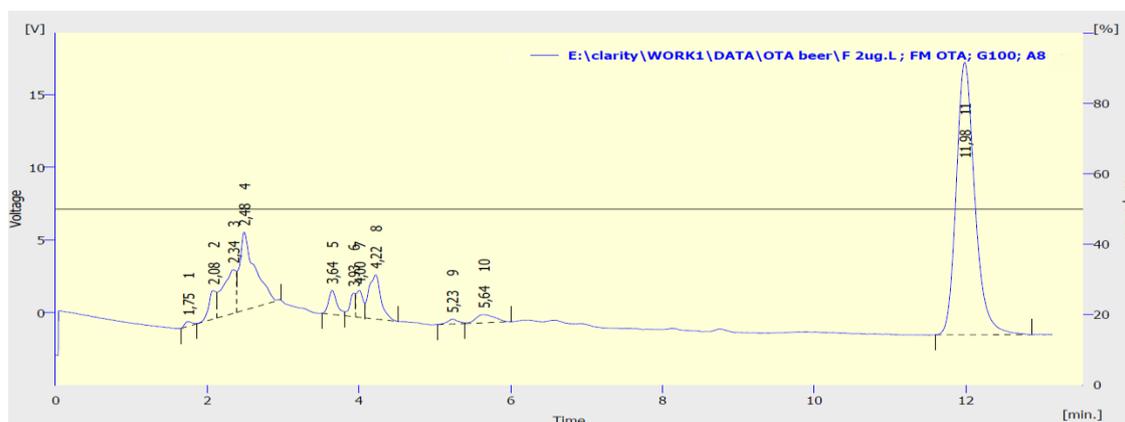


Figura 2.1. – Cromatograma de uma amostra fortificada com OTA a 2 µg/L.

2.3.2 Desempenho analítico

A curva de calibração foi obtida usando um processo de regressão linear dos mínimos quadrados da área do pico em função da concentração. A linearidade de OTA em fase móvel foi avaliada com as soluções de trabalho a cinco níveis de concentração, entre 2,5 e 25 ng/mL. O resultado encontrado foi adequado como se verifica pelo coeficiente de correlação ($R^2=0,998$) (Figura 2.2).

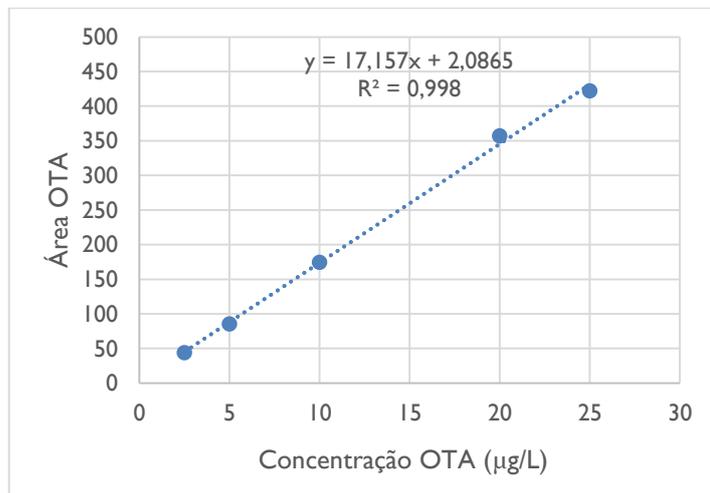


Figura 2.2 – Curva de calibração OTA em fase móvel.

A curva de calibração em matriz foi obtida com diferentes concentrações de OTA, entre 0,25 e 2,5 µg/L, verificando-se linearidade adequada como se verifica pelo coeficiente de correlação, $R^2=0,9985$ (Figura 2.3).

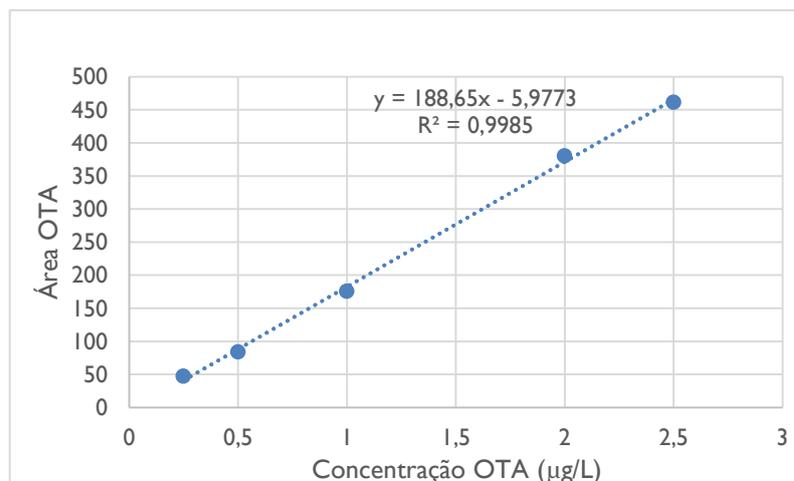


Figura 2.3 – Curva de Calibração em Matriz.

Como demonstram estas curvas de calibração, tanto em fase móvel como em matriz, a linearidade é apropriada. As curvas de calibração foram usadas para calcular o efeito de matriz (ME), dividindo o declive da calibração correspondente na matriz (B) pelo declive da calibração do padrão em fase móvel (A). Assim, a razão $(B/A \times 100)$ foi definida como o efeito de matriz absoluto (ME %). O valor obtido foi interpretado da seguinte forma: um valor de 100% demonstra uma ausência de efeito de matriz, um valor superior a 100% indica um aumento do sinal e abaixo de 100% uma supressão de sinais (Rubert *et al.*, 2011).

O valor do efeito matriz obtido foi de 100,05%.

A exatidão é estimada pela percentagem de recuperação obtida através da razão entre a quantidade de substância recuperada, após execução do processo analítico, e a quantidade de substância adicionada a uma amostra, de preferência isenta do analito em estudo. A exatidão dos diferentes métodos utilizados foi avaliada através dos ensaios de fortificação a 0,1 µg/L, 0,5 µg/L, 1 µg/L e 2 µg/L. As recuperações médias variaram de 99-1458%, para os métodos 5 e 2 a níveis de 0,5 µg/L, ND-209%, no caso dos métodos 4 e 2 a níveis de 1 µg/L, e 50-113% para os métodos 1 e 2 a níveis de 2 µg/L. Assim, os resultados de exatidão não observam aos requisitos estabelecidos pela Diretiva CE 401/2006, excepto os métodos 2 e 3, para o nível de fortificação de 2 µg/L e o método 5 para os níveis de fortificação de 0,5; 1 e 2 µg/L (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Exatidão dos métodos 1, 2, 3, 4 e 5.

Métodos	Nível Fortificação (µg/L)	Exatidão (%)
1	2	50
2	2	105
3	2	113
2	0,5	1485
2	1	209
4	2	80
4	1	ND
5	2	90
5	1	95
5	0,5	99

As colunas de imunoafinidade (IAC) revelaram melhores resultados comparando com os resultados obtidos com as colunas Oasis HLB. As IACs são colunas de purificação com maior especificidade para a micotoxina em estudo. Deste modo, o método 5 foi o escolhido como o melhor método para estudar a OTA em cerveja por apresentar percentagens de recuperação perto de 100% para os níveis de fortificação estudados.

A exatidão do método selecionado (método 5) foi avaliada através dos ensaios de fortificação a 0,5 µg/L, 1 µg/L e 2 µg/L, com três replicados para cada nível, numa amostra de cerveja. As recuperações médias variaram de 81%, 86% e 85% para os níveis de fortificação de 0,5 µg/L, 1 µg/L e 2 µg/L, respetivamente (Tabela 2.2).

A precisão do método utilizado foi avaliada através da repetibilidade intra-dia e inter-dia. A repetibilidade intra-dia variou entre 2,43 e 1,72 para níveis de fortificação 0,5 e 2 µg/L, respetivamente. A repetibilidade inter-dia variou entre 2,74 e 6,25 para 0,5 e 2 µg/L, respetivamente. É de salientar que os valores encontrados, tanto para a exatidão como para a precisão, cumpriram os requisitos estabelecidos para a Diretiva CE 401/2006 (EC, 2006).

Tabela 2.2 - Estudo de validação da metodologia analítica para a determinação de OTA em cerveja

Fortificação (µg/L)	Exatidão (%)	Repetibilidade intra-dia (RSD)	Repetibilidade inter-dia (RSD)
0,5	81	2,43	2,74
1	86	2,36	5,26
2	85	1,72	6,25

O LOD e o LOQ foram estabelecidos pela quantidade de analito que produz um sinal/ruído de rácio de 3:1 e 10:1, respetivamente. Ambos foram obtidos através do cálculo da curva de calibração, com os valores de 0,14 e 0,43 µg/L, respetivamente. Estes valores são satisfatórios considerando a matriz analisada.

Os LODs descritos na literatura variam muito, podendo ir de 0,8 ng/L a 100 ng/L. No entanto, há vários autores cujos valores encontrados são similares ao deste estudo, tais como 100 ng/L (Al-Taher *et al.*, 2013, Kawashima *et al.*, 2007, e Ventura *et al.*, 2006), 200 ng/L (Park *et al.*, 2005) e 73-270 ng/L (Novo *et al.*, 2013).

2.3.3 Ocorrência da OTA em cerveja

Nesta investigação foram estudadas 33 cervejas das quais 31 eram loiras e 2 pretas, adquiridas em supermercados da região centro do País. Nove amostras (27,27%) estavam contaminadas, com teores que variaram entre 0,174 e 11,25 µg/L, conforme ilustra a tabela 2.3. Destas, três continham milho, duas continham trigo e as outras quatro assinalavam apenas a presença de malte de cevada. As concentrações encontradas foram de 0,174 µg/L, 0,54 µg/L e 1,22 µg/L para as amostras com milho, 0,50 µg/L e 1,81 µg/L, para as amostras que continham trigo, e 1,81 µg/L, 1,74 µg/L, 9,21 µg/L e 11,25 µg/L para as restantes, sendo que no caso destas duas últimas se tratava de amostras de fabrico caseiro.

Segundo a literatura científica foi detetada a ocorrência de OTA em amostras de cerveja em baixas concentrações. Nestes estudos os teores mínimos e máximos variaram entre 0,0009 e 1,20 µg/L, respetivamente (Aresta *et al.*, 2006; Belakova, 2011; Bertuzzi *et al.*, 2011; Goryacheva *et al.*, 2008; Lhotská *et al.*, 2016; Madhavi *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2005, 2006; Ostry *et al.*, 2015; Soto *et al.*, 2014). Por outro lado, outras investigações indicam que foram também encontrados teores mínimos e máximos com concentrações mais elevadas, variando entre 1 a 10 µg/L, respetivamente (Kawashima *et al.*, 2007; Reinsch *et al.*, 2007; Rubert *et al.*, 2013). Contudo, um dos estudos revelou valores bastante mais elevados com teores até 2340 µg/L (Odhav & Naicker, 2002) (Tabela 1.4).

Neste estudo constatou-se que os teores encontrados são semelhantes aos de outros estudos efetuados em distintos países. Porém, duas amostras caseiras apresentaram teores muito elevados, com 9,21 µg/L e 11,25 µg/L. Dado que atualmente não estão estabelecidos LM de OTA para a cerveja mas tomando em consideração o LM estabelecido para o vinho de 2 µg/L (EC N° 1881/2006), as duas amostras referidas ultrapassam cerca de 2,5 vezes e 5,5 vezes aquele limite.

Relativamente à totalidade das amostras analisadas, a frequência de deteção de OTA foi de 27,3% e os níveis médios encontrados de 0,86 µg/L (Tabela 2.4). Quanto às amostras de cerveja loira, a frequência foi de 29%, tendo os teores nas amostras contaminadas oscilado entre 0,174 e 11,25 µg/L, com teores médios de 3,14 µg/L. Em contraponto nas duas amostras de cerveja preta não foi detetada a presença de OTA (Tabela 2.4).

Neste estudo verificou-se que das nove amostras contaminadas, oito foram fabricadas em Portugal, o que evidencia a necessidade de um maior controlo.

Tabela 2.3 – Teores ($\mu\text{g/L}$) de OTA em amostras de cerveja.

Cerveja	Teor encontrado ($\mu\text{g/L}$)	
Cerveja Loira		
8ª colina (artesanal)	ND	
Affligem	ND	
Carlsberg	1,81	>LOQ
Cergal	ND	
Cerveja Caseira —	11,25	>LOQ
Cerveja Caseira O	9,21	>LOQ
Cerveja de autor APA de Aveiro	ND	
Cerveja de Autor de Trigo Aveiro	1,81	>LOQ
Corona	ND	
Cristal	ND	
Dois corvos (artesanal)	ND	
Duvel	1,74	>LOQ
Erdinger	ND	
Franziskaner	ND	
Hoegaarden	ND	
Holbrand sem álcool	ND	
Lefte	ND	
Letra B (artesanal)	ND	
Marina	ND	
Mongozo sem Gluten	ND	
Musa	ND	
Sagres	0,174	> LOD < LOQ
Sagres Radler	ND	
Salineira (artesanal)	ND	
Sovina (artesanal)	ND	
Stella Artois	ND	
Super Bock	1,22	>LOQ
Topázio	ND	
Tricana (artesanal)	0,54	>LOQ
Vadia (artesanal)	0,50	>LOQ
Zywiec	ND	
Cerveja Preta		
Onyx	ND	
Super Bock	ND	

ND – não detetado

Tabela 2.4 - Frequência (%) e teores ($\mu\text{g/L}$) de OTA em cervejas loira e preta.

Tipo de cerveja	Amostragem	Frequência (%)	Varição min-máx	Média
Loira	31	9 (29)	0,174 – 11,25	3,14
Preta	2	0	ND	-
Total	33	9 (27,3)	0,174 – 11,25	0,86

A análise dos dados sobre a frequência, as variações e os valores médios de OTA relativamente ao tipo de fabrico utilizado na produção de cerveja encontra-se explicitada na tabela 2.5. Estes dados revelaram uma maior frequência de deteção das amostras artesanais/caseiras/de autor, 45,5%, face às de fabrico industrial, 20%. Situação análoga foi verificada para os teores médios, 1,24 $\mu\text{g/L}$ para as amostras de fabrico industrial versus 4,66 $\mu\text{g/L}$ para o grupo das amostras de fabrico diverso.

Tabela 2.5 - Frequência (%) e teores ($\mu\text{g/L}$) em cervejas loiras de produção industrial e cervejas produzidas de forma artesanal/caseira/de autor.

Tipo de fabrico	Amostragem	Frequência (%)	Varição ($\mu\text{g/L}$)	Média ($\mu\text{g/L}$)
Industrial	20	4 (20)	ND – 1,81	1,24
Artesanal/Caseiro/Autor	7/2/2 (11)	5 (45,5)	ND – 11,25	4,66

No caso das amostras que continham trigo e milho, os valores obtidos devem-se ao facto de estes serem cereais mais propícios a uma contaminação, essencialmente, durante o armazenamento em condições de humidade favoráveis. Nas amostras caseiras, os cereais usados para a produção de cerveja são vendidos em embalagens de plástico correndo um risco maior de sofrerem um armazenamento inadequado devido à humidade que, por conseguinte, favorece a sua contaminação. Outra das razões dever-se-á ao facto destas cervejas não estarem sujeitas a um controlo de qualidade, bem como os respetivos cereais embalados não terem um controlo tão rigoroso como os usados nas cervejas de fabrico industrial.

2.3.4 Ingestão diária estimada da OTA e respetiva avaliação de risco

Neste estudo, a ingestão diária de ocratoxina A pelo consumo de cerveja foi calculada pela seguinte fórmula: $EDI = (\sum c \times C) / (N \times D \times K)$. Os valores foram usados com base nas contaminações encontradas no presente estudo, no consumo de cerveja pela população portuguesa (53 L/habitante), no número de amostras analisadas, no número de dias do ano e ainda no peso corporal dos adultos em Portugal (69 kg) (2.1.5).

Assim, foram efetuadas três avaliações da EDI tendo por base três cenários diferentes. No primeiro foram tomados em consideração os níveis médios de OTA para a totalidade das amostras analisadas, no segundo foram considerados os teores médios de OTA nas amostras contaminadas e no terceiro a base usada foi o pior cenário. Na primeira avaliação a EDI foi de 1,801 ng/kg p.c./dia, na segunda de 6,606 ng/kg p.c./dia e para o pior cenário de 23,67 ng/kg p.c./dia.

Para a avaliação do risco foi utilizado o valor mais recente estabelecido pela EFSA, em 2006, para uma TWI de 120 ng/kg p.c./semana. Na primeira avaliação a percentagem de ingestão semanal estimada (EWI) face à TWI foi de 10,5%, na segunda de 38,5% e na terceira de 138,01%. Nas duas primeiras situações, a ingestão de OTA através do consumo de cerveja não apresenta risco para a saúde dos respetivos consumidores. Situação inversa foi observada para o pior cenário. Porém, se se tomar em consideração o valor da TDI anteriormente estabelecido pelo SCF de 5 ng/kg p.c./dia, na primeira situação o consumo de cerveja não apresenta risco para o consumidor, 36,04% da TDI, enquanto na segunda e na terceira avaliações os valores foram de 132% e 473,5% respetivamente, o que evidencia elevado risco para a saúde das populações.

Conclusão

O pré-tratamento da amostra com bicarbonato de sódio e PBS e a centrifugação permite que o sobrenadante seja aplicado numa coluna IAC, possibilitando alcançar baixos níveis de detecção e quantificação. Esta metodologia analítica otimizada permitiu obter resultados de exatidão, repetibilidade, precisão e sensibilidade adequados, utilizando uma detecção por HPLC-FD. Sendo assim, esta metodologia foi adequada para a detecção e quantificação da OTA em cerveja, apresentando um limite de detecção de 0,14 µg/L.

A aplicação deste método a 33 amostras mostrou que 27,27% das amostras estavam contaminadas, sendo que duas delas, de produção caseira, apresentaram concentrações consideráveis, 9,21-11,25 µg/L. A discrepância encontrada pode ser explicada pelo armazenamento dos cereais já preparados para o fabrico daquele tipo de cerveja, sendo que este também não tem um controlo tão rigoroso quanto o outro.

Na União Europeia apenas se encontram limites máximos estabelecidos para a OTA em alguns produtos. A legislação atual não inclui limites para a ocorrência de OTA em cerveja, porém devem ser consideradas as concentrações identificadas, sobretudo das cervejas caseiras.

Por este motivo, é importante adotar medidas preventivas e desenvolver programas de controlo, revendo os pontos críticos onde pode ocorrer a produção de OTA, com o intuito de minimizar a exposição humana à OTA.

Referências Bibliográficas

AL-TAHER, F., BANASZEWSKI, K., JACKSON, L., ZWEIGENBAUM, J., RYU, D., & CAPPOZZO, J. - A rapid method for the determination of multi-mycotoxins in wines and beers by LC-MS / MS using a stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, (2013), 2378–2384.

ANLI, E., ALKIS, I. - Ochratoxin A and brewing technology: A Review. *Journal Institute Brewing*, 116(1), (2010), 23–32.

ARESTA, A., PALMISANO, F., VATINNO, R., & ZAMBONIN, C. G. - Ochratoxin A determination in beer by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection: a fast and sensitive method for assessment of noncompliance to legal limits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), (2006), 1594–1598.

AREZES, P. M., BARROSO, M. P., CORDEIRO, P., COSTA, L. G., & MIGUEL, A. S. - Estudo Antropométrico da População Portuguesa (1st ed.). Lisboa: Instituto para a Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho, (2006).

BĚLÁKOVÁ, S., BENEŠOVÁ, K., MIKULÍKOVÁ, R., & SVOBODA, Z. - Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 126(1), (2011), 321–325.

BERTUZZI, T., RASTELLI, S., MULAZZI, A., DONADINI, G., & PIETRI, A. - Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control*, 22(12), (2011), 2059–2064.

BUI-KLIMKE, T. R., & WU, F. - Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 55), (2015).

Comissão Europeia - Regulamento (CE) N°105/210 da Comissão de 5 de Fevereiro de 2010 que altera o Regulamento (CE) N°1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito à ocratoxina A. *Jornal Oficial da União Europeia*. L35/7 (2010).

Comissão Europeia - Regulamento (CE) N°1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L364/5 (2006).

European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. (2006) 365:1–56.

GORYACHEVA, I. Y., BASOVA, E. Y., VAN PETEGHEM, C., EREMIN, S. A., PUSSEMIER, L., MOTTE, J. C., & DE SAEGER, S. - Novel gel-based rapid test for non-instrumental detection of ochratoxin A in beer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2), (2008), 723–727.

HARCZ, P., TANGNI, E. K., WILMART, O., MOONS, E., VAN PETEGHEM, C., DE SAEGER, S., LARONDELLE, Y. & PUSSEMIER, L. - Intake of ochratoxin A and deoxynivalenol through beer consumption in Belgium. *Food Additives and Contaminants*, 24, (2007), 910–916.

HEUSSNER, A. & BINGLE, E. - Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*, 7, (2015), 4253–4282.

JOINT FAO/WHO COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA) - Evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-eighth report) of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). In: WHO Technical Report Series, (2007).

KABAK, B. - Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), (2009), 348–352.

KAWASHIMA, L., VIERIA, A., SOARES, L. - Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Ciência Tecnologia Alimentar*, 27(2), (2007), 317–323.

KUIPER-GOODMAN, T., HILTS, C., BILLIARD, S. M., KIPARISSIS, Y., RICHARD, I. K., AND HAYWARD, S. - Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives and Contaminants*. 27, (2010), 212–240.

LHOTSKÁ, I., SATÍNSKY, D., HAVLÍKOVÁ, L., & SOLICH, P. - A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(12), (2016), 1–11.

MAHDAVI, R., KHQRRAMI, S., JABBARI, M. - Evaluation of ochratoxin A contamination in non alcoholic beers in Iran. *Journal of Biological Sciences* 2 (5), (2007), 546–550.

MEDINA, Á., VALLE-ALGARRA, F. M., GIMENO-ADELANTADO, J. V., MATEO, R., MATEO, F., & JIMÉNEZ, M. - New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of Chromatography A*, 1121(2), (2006), 178–183.

MEDINA, Á., JIMÉNEZ, M., GIMENO-ADELANTADO, J., VALLE-ALGARRA, F., MATEO, R. - Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A*, 1083(2), (2005), 7–13.

MONACI, L., & PALMISANO, F. - Determination of ochratoxin A in foods: State-of-the-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(1), (2004), 96–103.

NOVO, P., MOULAS, G., PRAZERES, D. M. F., CHU, V., & CONDE, J. P. -. Detection of ochratoxin A in wine and beer by chemiluminescence-based ELISA in microfluidics with integrated photodiodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 176, (2013), 232–240.

ODHAV, B., & NAICKER, V. - Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), (2002), 55–61.

OLSEN, M., THORUP, I., KNUDSEN, I., LARSEN, J. J., HALD, B., AND OLSEN, J. - Health evaluation of ochratoxin A in food products. Nordic Council of Ministers, Copenhagen, (1991).

OSTRY, V., MALIR, F., DOFKOVA, M., SKARKOVA, J., PFOHL-LESZKOWICZ, A., & RUPRICH, J. - Ochratoxin A dietary exposure of ten population groups in the Czech Republic: Comparison with data over the world. *Toxins*, 7(9), (2015), 3608–3635.

PARK, J. W., CHUNG, S. H., & KIM, Y. B. - Ochratoxin a in Korean food commodities: Occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), (2005), 4637–4642.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., & MANDERVILLE, R. A. - Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), (2007), 61–99.

- PRELLE, A., SPADARO, D., DENCA, A., GARIBALDI, A., & GULLINO, M. L. - Comparison of clean-up methods for ochratoxin A on wine, beer, roasted coffee and chili commercialized in Italy. *Toxins*, 5(10), (2013), 1827–1844.
- REINSCH, M., TÖPFER, A., LEHMANN, A., NEHLS, I., & PANNE, U. - Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. *Food Chemistry*, 100(1), (2007), 312–317.
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y. J., & LARONDELLE, Y. - Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), (2006), 18–46.
- RUBERT, J., SOLER, C., MARÍN, R., JAMES, K. J., & MAÑES, J. - Mass spectrometry strategies for mycotoxins analysis in European beers. *Food Control*, 30(1), (2013), 122–128.
- SÁEZ, J. M., MEDINA, Á., GIMENO-ADELANTADO, J. V., MATEO, R., & JIMÉNEZ, M. - Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1029(1–2), (2004), 125–133.
- SERRA, R., ABRUNHOSA, L., KOZAKIEWICZ, Z., & VENÂNCIO, A. - Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), (2003), 63–68.
- SOTO, J., FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M., RUIZ, M. J., & JUAN-GARCÍA, A. - Presence of ochratoxin A (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: Wine and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), (2014), 7643–7651.
- TAMURA, M., UYAMA, A., & MOCHIZUKI, N. - Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 27(6), (2011), 629–635.
- TANGNI, E. K., PONCHAUT, S., MAUDOUX, M., ROZENBERG, R., & LARONDELLE, Y. - Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, 19(12), (2002), 1169–79.

VENTURA, M., GUILLÉN, D., ANAYA, I., BROTO-PUIG, F., LIBERIA, J. L., AGUT, M. COMELLAS, L. - Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 20: (2006) 31993–204.

WU, J., TAN, Y., WANG, Y., & XU, R. - Occurrence of ochratoxin A in wine and beer samples from China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 3210(July), (2011).

ANEXO

Anexo – informação do rótulo das amostras de cerveja.

Cerveja	Volume álcool (%)	Ingredientes	Produzida	Lote
Cerveja nacional				
Cristal	5,1	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados (milho), Lúpulo	Portugal	941017201:55
Letra B (artesanal)	5,0	Água, Malte de cevada, Lúpulo e Levedura	Portugal (Vila Verde)	L75-2016
Sagres	5,0	Água, Malte de cevada, Milho, Cevada, Extrato de Lúpulo	Portugal	3582822254
Topázio	5,6	Água, Malte de cevada, e Extrato de Lúpulo	Portugal Coimbra	L190117
Super Bock Preta	5,0	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados (Milho e Cevada) e Lúpulo	Portugal	L2215273
Onyx Preta	4,5	Água, Malte de cevada e Extrato de Lúpulo	Portugal Coimbra	110117
Cerveja de Autor Trigo de Aveiro	4,7	Água, Malte de Cevada e Trigo, Lúpulo e Levedura	Portugal Aveiro	L001
Carlsberg	5,0	Água, Malte de cevada, e Lúpulo	Portugal	L9313972
Sovina (artesanal)	4,9	Água, Malte de cevada, Lúpulo e Levedura	Portugal	02-17
Marina	5,0	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados (Milho e Cevada) e Lúpulo	Portugal	L26091732002
Vadia	5,2	Água, Malte de cevada e de Trigo, Lúpulo e Leveduras	Portugal	L26/2017TB
Super Bock	5,2	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados (Milho e Cevada) e Lúpulo	Portugal	L9311072
Tricana (Artesanal)	6,0	Água, Malte, Milho, Lúpulo e Levedura	Portugal Aveiro	1005/2017
Musa	6,5	Água, Malte de cevada, Lúpulo e Levedura	Portugal	B18
Salineira (artesanal)	7,5	Água, Malte, Lúpulo e Levedura	Portugal Aveiro	0803/2017
Cerveja de autor APA de Aveiro	5,8	Água, Maltes, Lúpulo e Levedura	Portugal Aveiro	L004

Anexo – informação do rótulo das amostras de cerveja (continuação).

Cerveja	Volume álcool (%)	Ingredientes	Produzida	Lote
Cergal	4,7	Água, Malte de Cevada, Milho, Extrato de Lúpulo	Portugal	3585530664
Dois corvos (artesanal)	5	Água, Maltes, Lúpulo e Levedura	Portugal Lisboa	L06012017
8ª colina (artesanal)	6	Água, Maltes, Lúpulo e Leveduras	Portugal	L030138
Sagres Radler sem álcool	0,03	41,6% Cerveja sem álcool (Água, Malte de cevada, Extrato de Lúpulo), 51,2% de água carbonatada, frutose, sumos de fruta à base de concentrado (Limão 2,7%, Laranja 1,4%, Lima 0,5%, Acerola a 0,3%), extrato concentrado de limão, aromas naturais, estabilizador: goma de alfarroba	Portugal	3585540664
Duas Cervejas Caseiras			Portugal	---
Cerveja Importada				
Affligem	6,7	Malte de cevada, Xarope de glucose, Lúpulo e Extrato de Lúpulo	Bélgica	SPE-17 62732850332
Erdinger	5,3	Água, Malte de trigo e de cevada, Lúpulo e Levedura	Alemanha	L0511051
Corona	4,5	Água, Malte de cevada, Milho, Arroz, Lúpulos	México	LA161217
Holbrand sem álcool	0,05	Água, Malte de cevada, Maltose, Extrato de Lúpulo	Holanda	C5c951214L
Duvel	8,5	Água, Malte de cevada, Glicose e Extrato de Lúpulo	Bélgica	L21908
Leffe	6,6	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados e Lúpulo	Bélgica	49
Franziskaner	5,0	Água, Malte de Trigo e de cevada, Levedura e Extrato de Lúpulo	Alemanha	L138736
Zywiec	5,6	Água, Malte de cevada e Lúpulo	Polónia	70671681922
Stella Artois	5,0	Água, Malte de cevada, Cereais não maltados e Lúpulo	Bélgica	551
Hoegaardan	4,9	Água, Malte de Trigo e cevada, Lúpulo e Especiarias	Bélgica	02261:3336
Mongozo sem Glúten	5,0	Água, Malte de Cevada, Lúpulo e Levedura – Sem Glúten	Espanha	L1116138